2443 N. 26

Lane Medical Library

Zur Kenntnis des chemischen Verhaltens der Toxine.

INAUGURAL-DISSERTATION
WELCHE
ZUR ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE
IN DER
MEDICIN UND CHIRURGIE
MIT ZUSTIMMUNG
DER MEDICINISCHEN FACULTÄT
DER
FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN
am 14. August 1907
NEBST DEN BEIGEFÜGTEN THESEN
ÖFFENTLICH VERTEIDIGEN WIRD
DER VERFASSER

Dr. rer. nat. Arnold Eisenmann
aus Russland.

OPPONENTEN:
Dr. T. Brabander.
Dr. H. Goldszmit.
cand. med. L. Hirschfeld.

Berlin.
Druck von E. Ebering
Mittelstrasse 29.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Referent: Prof. Dr. **J. Orth.**

In den nahezu zwanzig Jahren, die seit der Entdeckung des ersten Toxins, des Diphtherietoxins, durch Roux und Yersin verflossen sind, haben unsere Kenntnisse von dem biologischen Verhalten der Toxine an Breite und Tiefe ausserordentlich gewonnen. Im Gegensatz hierzu sind unsere Vorstellungen über die chemische Konstitution der Toxine kaum einen Schritt weiter gekommen. Die Erklärung hierfür ist leicht zu geben. Wir müssen wohl voraussetzen, dass wir im Toxinmolekül einen ausserordentlich komplizierten Bau zu erblicken haben. Zum mindesten sind wir berechtigt, aus der Tatsache, dass die Toxine in ihren Lösungen nicht die Fähigkeit besitzen, durch tierische Membranen zu dialysieren, auf eine erhebliche Grösse und damit nach Analogie vieler anderer organischen Verbindungen auf einen höchst verwickelten Bau zu schliessen. Auch die Eigenartigkeit der physiologischen Wirkung der Toxine weist darauf hin, dass hier Substanzen von ganz besonders kompliziertem Aufbau vorliegen. Wenn wir annehmen, was wohl berechtigt erscheint, dass einzelne Gruppen verschiedenen Toxinen gemeinsam zukommen, so weist doch das ausserordentlich differente physiologische Verhalten darauf hin, dass jedem einzelnen Toxin besondere Gruppen zukommen, die gerade als die für seine Wirkung charakteristischen anzusehen sind, und die, bei dem gegenwärtigen Stande unserer Methodik, der chemischen Erforschung keine Aussicht auf Erfolg bieten. Eine zweite Reihe von ausserordentlich differenten und wiederum für jedes einzelne Toxin spezifischen Atomgruppierungen erschliesst uns die Reaktion der Toxine mit ihren Antitoxinen und deren Spezifität. Es war für die Er-

forschung dieses Gebietes von entscheidender Bedeutung, dass Ehrlich in der klaren Erkenntnis der Unmöglichkeit einer Erforschung der Toxine mit chemischen Methoden einerseits, und andererseits der Notwendigkeit chemischer Vorstellungen, ein eigenes System von Symbolen einführte, die sich in der Folge von grossem Wert für die Auffindung neuer und für die Ordnung gefundener Tatsachen erwies. Unter Berücksichtigung dieser Ehrlichschen Symbole, deren wichtigsten die haptophore und toxophore Gruppe der Toxine bilden, ist es möglich, das Verhalten der Toxine inbezug auf den Organismus, den Vorgang der Antitoxinbildung und die Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin durch Analogien mit uns geläufigen chemischen Vorstellungen dem Verständnis näher zu bringen. — Abgesehen von den Schwierigkeiten einer rein chemischen Erforschung, wie sie offenbar durch die Konstitution des Toxinmoleküls bedingt sind, stellen sich neue Schwierigkeiten besonderer Art in den Weg. Es ist dies vor allem die ausserordentliche Labilität der Toxine. Unterliegen dieselben schon in wässerlichen Lösungen ausserordentlich leicht zerstörenden Einflüssen, so ist diesen bei allen chemischen Manipulationen Thür und Thor geöffnet, und alle Prozeduren, welche eine Reinigung der Toxine bezwecken, das Ausfällen und Wiederauflösen, die Zusätze von Säuren und Alkalien, Erwärmen, Dialysieren, sind mit so grossen Verlusten verbunden, dass am Ende auch nur mehr Spuren von Toxin übrig sind. Hierzu kommt noch, dass offenbar die Toxinlösungen, die uns als Ausgangsmaterial dienen, das Toxin in ausserordentlich geringer Konzentration enthalten, und dass indifferente Substanzen in diesen Lösungen weitaus überwiegen. Sind diese nun auch noch, wie dies stets der Fall ist, von eiweissartigem Charakter, so setzen sie der Reinigung der Toxine ganz besondere Schwierigkeiten entgegen, da diese bei Fällungsreaktionen mit den Eiweisskörpern zusammen niedergerissen werden. Nur mittels Anwendung eines sehr geistreichen Kunstgriffes gelang es

Jacoby (2) das Ricin von den begleitenden Eiweisskörpern zu trennen und eine wirksame Toxinlösung herzustellen, welche keine Biuretreaktion mehr gab, womit allerdings bei der geringen absoluten Menge noch nicht gegen die Eiweissnatur des Ricins entschieden ist.

Wenn wir vorläufig in vieler Hinsicht zu einem Verzicht inbezug auf die chemische Erforschung der Toxine gezwungen sind, so erscheint es doch von grösster Wichtigkeit, das Verhalten der Toxine unter dem Einfluss der verschiedensten chemischen und physikalischen Agentien zu erforschen. Auch für die Möglichkeit späterer Reindarstellung ist es zuerst unerlässlich, die Bedingungen für die Existenz und etwaige Veränderungen der Toxine auf das genaueste kennen zu lernen. Ich verweise hier nur auf die später noch eingehend zu erörternde Tatsache, dass die Toxine des Cobragiftes in saurer Lösung einen ausserordentlich hohen Grad von Resistenz erlangen, woraus sich schon die Regel ergibt, Reinigungsmanipulationen in saurer Lösung vorzunehmen.

Von besonderer Wichtigkeit ist aber eine genaue Kenntnis des Verhaltens der Toxine chemischen Einflüssen gegenüber inbezug auf ihre biologisch wichtigsten Reaktionen, auf ihre Wirkungen im Tierkörper, und auf ihr Verhalten zu den Antitoxinen. Es wird auf diesen Punkt bei der Besprechung unserer Versuche noch zurückzukommen sein.

Es ergibt sich aus dem Gesagten, dass es in hohem Grade unzweckmässig ist, zunächst das Verhalten an solchen Toxinen zu prüfen, welche sich durch einen hohen Grad von Labilität auszeichnen. Wir wissen, dass eine grosse Anzahl von Toxinen in wässrigen Lösungen auch bei niedrigen Temperaturen einer wie man sagt spontanen Abschwächung unterliegen: sie verlieren mehr oder weniger rasch ihre Wirksamkeit, indem dabei vielleicht Toxoide im Sinne Ehrlichs entstehen. Alle derartigen Gifte eignen sich nicht für Versuche, da man nicht einmal im Stande ist, die spontane Zersetzung, deren Regel wir nicht kennen, auszuschliessen, oder

irgendwie mit Sicherheit in Rechnung zu bringen. Zu den labilsten Giften dieser Art sind vor allem die Gifte des Tetanusbazillus, das Tetanospasmin und das Tetanolysin zu rechnen, deren Studium deshalb auch mit besonders grossen Fehlerquellen behaftet ist. Eine Mittelstellung nimmt das Diphtheriegift ein, bei dem die spontane Abschwächung in der Regel langsam verläuft. Aber bei den meisten Toxinen ist die Anwendung höherer Temperatur ausgeschlossen, da schon bei Temperaturen zwischen 50° und 70° eine rapide Zerstörung erfolgt.

Angesichts dieser ungünstigen Sachlage bedeutete es einen sehr grossen technischen Fortschritt, dass durch das Studium der Schlangengifte Substanzen vom Charakter der echten Toxine bekannt wurden, die in vielfacher Hinsicht günstige Eigenschaften zeigten und sich weit besser als alle übrigen behandelten Toxine zu einem eingehenden Studium ihrer chemischen Eigenschaften eigneten. Wir wollen in Folgendem auf eine Schilderung der Schlangengifte nur so weit eingehen, als ihr Verhalten den bisher genauer untersuchten physikalischen und chemischen Einwirkungen gegenüber in Betracht kommt.

Die Schlangengifte werden in der Regel von der lebenden Schlange gewonnen, die bei dem Biss aus den Kanälen ihrer Giftzähne das Sekret der Giftdrüse entleert. Man lässt die Schlangen entweder auf Uhrschälchen oder in Watte beissen und trocknet die erhaltene Flüssigkeit im Vacuum. Die gelben, glänzenden, oft krystallinische Beschaffenheit vortäuschenden Plättchen oder Borken bewahren dauernd eine leichte Löslichkeit in Wasser, respektive physiologischer Kochsalzlösung, und die Giftigkeit der auch nach jahrelanger Aufbewahrung des getrockneten Giftes hergestellten Lösungen zeigt keine Verminderung. Die Reaktion des frisch sezernierten Schlangengiftes wird als schwachsauer bezeichnet. Nach unseren Erfahrungen reagieren 1—2-prozentige Lösungen der verschiedensten

Schlangengifte auf Lackmus neutral, und nur bei einer 5 % Lösung von Krotalusgift konnten wir einmal eine ganz geringfügige Rötung blauen Lackmuspapiers konstatieren. Die Beobachtung anderer Autoren, dass Schlangengiftlösungen beim Stehen einen mehr oder weniger voluminösen Niederschlag fallen lassen, der aus eiweissartigen Stoffen bestehen soll, konnten wir nie bestätigen, und man darf wohl vermuten, dass hier Verunreinigungen durch sich entwickelnde Mikroorganismen vorlagen.

Die Giftwirkung der Schlangengifte beruht auf der Anwesenheit von in der Hauptsache drei verschiedenen Giften — erstens dem Neurotoxin, zweitens dem Hämorrhagin und drittens dem Hämolysin. Für die Giftwirkungen kommen bei Menschen und bei Versuchstieren in erster Linie das Neurotoxin und das Hämorrhagin in Betracht, und zwar ist das Symptomenbild ein verschiedenes, je nachdem das erstere oder das letztere prävaliert. Die Giftwirkung des Colubridengiftes beruht vorwiegend auf dem Neurotoxin, die des Viperidengiftes auf dem Hämorrhagin.

Dass den Giftwirkungen der verschiedenen Schlangenarten nicht ein einheitliches Gift zu Grunde liegen kann, ergibt sich schon daraus, dass, wie oben erwähnt, das Vergiftungsbild bei verschiedenen Schlangengiftarten jedesmal durch ein anderes Hauptsymptom beherrscht wird. Auch inbezug auf ihr Verhalten zum Antitoxin sind Schlangengifte verschiedenen Ursprungs keineswegs gleichartig und es weist auf tiefgehende Verschiedenheit in Aufbau derselben hin, dass Antitoxine, welche durch Immunisierung mit dem Gifte einer bestimmten Schlangenart erzeugt sind, sich den Giften anderer Spezies gegenüber wirkungslos erwiesen (6). Hieraus geht natürlich noch nicht hervor, dass das Sekret einer bestimmten Schlangenart nicht doch etwa ein einheitliches Gift enthält.

Zur Entscheidung dieser theoretisch und praktisch in gleicher Weise wichtigen Frage sind durch verschiedenartige Methoden bereits eine Reihe von Argumenten beigebracht.

Das gemeinsame aller dieser Methoden besteht darin, dass man es versucht, die eine der giftigen Komponenten aus den Giftlösungen zu entfernen, während die andere in derselben erhalten bleibt. Man kann hier eine Anzahl von Methoden anwenden, von denen wir hier diejenigen, welche zugleich von Bedeutung sind für das Verhalten der Schlangengifte gegen physikalische und chemische Eingriffe, besprechen wollen.

Eine vollständig exakte Trennung des Neurotoxins und des Hämolysins der Schlangengifte liefert die Methode von Kyes (4), welche zunächst etwas eingehender zu besprechen ist. Kyes fand bekanntlich, dass das Hämolysin der Schlangengifte in einer besonderen Beziehung zum Lecithin steht. Wir wollen die am besten studierten Verhältnisse, wie sie beim Cobragift vorliegen, besprechen. Versetzt man die Blutkörperchen gewisser Spezies, z. B. des Rindes, mit einer Lösung von Cobragift, so tritt selbst bei Anwendung sehr konzentrierter Lösungen eine Hämolyse nicht ein. Ein ganz anderes Bild tritt dagegen auf, so wie man den Gemischen von Cobragift und Blut eine geringe Menge Lecithin zusetzt. Schon ausserordentlich geringe Mengen des Cobragiftes zusammen mit einer Lecithinmenge, die an und für sich keinerlei Wirkung ausübt, bewirken Hämolyse. Die Vermutung von Kyes, dass das wirksame hämolytische Prinzip durch eine Vereinigung von Cobragift und Lecithin entsteht, hat sich in allen experimentellen Prüfungen als zutreffend erwiesen. Stellt man sich frische Gemische von Cobragift und Lecithin her, so findet man, dass dieselben erst nach Ablauf einer gewissen Zeit Hämolyse hervorbringen. Lässt man dagegen ein Gemisch von Cobragift und Lecithin erst längere Zeit stehen, bevor man das Blut zufügt, so kann man die Beobachtung machen, dass die Hämolyse momentan eintritt. Offenbar kann die hier in Betracht kommende Zeitdifferenz nur bezogen werden auf die Zeit, welche für die Reaktion zwischen Cobra-

gift und Lecithin erforderlich ist. Zur klaren Erkenntnis dieser Beziehungen führte aber erst die Isolierung des hämolytischen Prinzips. Kyes (5) bediente sich hierzu zweier Methoden, von denen wir nur die eine hier schildern wollen, da sie vornehmlich für die Trennung der beiden Komponenten, des Neurotoxins und des Hämolysins, in Betracht kommt. Kyes setzt zu einer wässrigen Lösung des Cobragiftes eine Lösung von Lecithin in Chloroform und schüttelt mehrere Stunden kräftig im Schüttelapparat. Hierauf wird in einer rasch laufenden Zentrifuge zentrifugiert, bis eine scharfe Trennung der unten stehenden Chloroformlecithinschicht und der darüber befindlichen wässrigen Schicht eingetreten ist. Versetzt man die Chloroformschicht mit dem mehrfachen Volumen Aether, so tritt nach und nach ein reichlicher flockiger Niederschlag ein, den man durch Filtrieren oder Abzentrifugieren isoliert und mehrmals mit Aether wäscht. Der Niederschlag ist in physiologischer Kochsalzlösung löslich. Lässt man die anfänglich klare Lösung niederschlagen, eine Zeit bei niedriger Temperatur stehen, so tritt eine Fällung ein, die sich bei 40° wieder löst. Prüft man nur das Verhalten dieser Lösung auf rothe Blutkörperchen, so beobachtet man bei Anwendung grösserer Mengen das Eintreten einer fast momentanen Hämolyse, kleinere Mengen lösen etwas langsamer. Sämtliche Blutarten jedoch werden ohne weiteren Zusatz von Lecithin zur Hämolyse gebracht. Die Lösung stellt nichts anderes dar, als die der Lecithinverbindung des Hämolysins des Cobragiftes. Untersucht man die wässrige Schicht auf ihre hämolytische Fähigkeit, so findet man dieselbe stark vermindert, und es ist möglich durch mehrmals wiederholtes Ausschütteln mit Chloroformlecithin in der eben geschilderten Weise sie endlich vollständig ihres hämolytischen Vermögens zu berauben und das gesamte Hämolysin in seine Lecithinverbindung überzuführen.

Prüft man nun die ihres Hämolysins vollständig beraubte

wässrige Schicht auf ihre neurotoxische Wirkung im Tierversuch, so findet man, dass dieselbe fast vollständig erhalten geblieben ist, und dass sie nach den üblichen allerdings nicht sehr exakten Methoden geprüft dieselbe neurotoxische Wirkung zeigt, wie die ursprüngliche Lösung des Cobragiftes. Allerdings haben neuerdings Morgenroth und Carpi nachgewiesen, dass auch ein kleiner Teil des Neurotoxins mit dem Lecithin reagiert und in die Chloroformlecithinschicht übergeht.

Jedenfalls lässt sich aber durch dieses Verfahren auf chemischem Wege zeigen, dass die neurotoxische und hämolytische Wirkung des Cobragiftes auf zwei verschiedenen Giften beruhen. Weitere Trennungsmethoden, von denen wir jetzt zu sprechen haben, beruhen auf der direkten Beeinflussung der Gifte in wässriger Lösung, also auf der Anwendung von Methoden, deren eine den Gegenstand unserer eigenen Untersuchungen bildet. — In einer demnächst erscheinenden Arbeit weist Carpi nach, dass bei kurz dauernder Behandlung von Cobragift mit Pepsin-Salzsäure eine vollständige Zerstörung des Hämolysins stattfindet, während das Neurotoxin unvermindert erhalten bleibt. Es ist also auch auf diese Weise die Selbständigkeit der beiden Componenten zu demonstrieren.

Ueber die Möglichkeit der Trennung der beiden Komponenten durch Bindung der einen derselben an Cholestearin wird demnächst Herr Mintz berichten.

Ein ganz besonders merkwürdiges Verhalten chemischen Einflüssen gegenüber zeigt das Hämorrhagin der Schlangengifte. Die Versuche von Morgenroth und Rosenthal (11) zeigten nämlich, dass in saurer Lösung eine ungemein rasche Veränderung des Krotalusgiftes eintritt — es genügt eine Konzentration von ca. n/400 Salzsäure, um das hämorrhagische Prinzip des Giftes unwirksam zu machen, wobei die neurotoxische Komponente erhalten bleibt und zur Wirkung kommt. Diese Ent-

giftung des Hämorrhagins ist nicht reversibel — nach Abstumpfung der Säure kehrt die hämorrhagische Wirkung nicht wieder. — Es ist nur von grossem Interesse, dass, im Gegensatz zu dem eben geschilderten Verhalten des Hämorrhagins, das in dem Krotalusgift gleichzeitig erhaltene Neurotoxin eine hochgradige Resistenz der Säurewirkung gegenüber aufweist. Bekanntlich spielt bei der Wirkung frischer Gifte der Viperiden das Neurotoxin eine ausserordentlich geringe Rolle, da die hämorrhagischen Symptome im Vordergrund des Vergiftungsbildes stehen. Erst durch die in der eben geschilderten Weise durchgeführte Entfernung der hämorrhagischen Komponente gewinnt man einen Einblick in den Neurotoxingehalt dieser Gifte, wie dies bereits von Morgenroth und Rosenthal geschildert worden ist. Es gibt also die ausserordentlich grosse Empfindlichkeit des Hämorrhagins einerseits und die Resistenz des Neurotoxins gegen Säure andererseits die Grundlage eines Trennungsprinzips von allgemeiner Verwendbarkeit. Die Resistenz gewisser Komponenten der Schlangengifte in saurer Lösung ist ein Phänomen, welches bisher auf dem Toxingebiet einzig dasteht. Die Regel bei allen bekannten Toxinen ist die, dass sowohl die Einwirkung von Säuren wie von Alkalien eine rasche Giftzerstörung zur Folge hat. Nach Erfahrungen, die vielfach gemacht worden sind, werden durch Alkalien auch die Schlangengifte rasch zerstört.

Für die hämolytische Komponente des Cobragiftes zeigten nun Kyes und Sachs (4) dass dieselbe in saurer Lösung nicht nur nicht zerstört wird, sondern sogar eine ausserordentlich hochgradige Resistenz gegen thermische Einflüsse gewinnt. Während nach den Versuchen von Kyes und Sachs eine Giftlösung durch 20 Minuten langes Erwärmen auf 100^0 vollständig ihrer Wirksamkeit beraubt wird, kann man sie bei einem Gehalt von $n/_{18}$ Salzsäure eine halbe Stunde lang auf 100^0 erhitzen, ohne dass sie eine Einbusse an hämolytischer Fähigkeit erleidet; erst nach

2-stündigem Verweilen bei 100° fanden Kyes und Sachs das Hämolysin vollständig zerstört. Auf diese letztere Beobachtung ist noch zurückzukommen.

Im Anschluss an diese Beobachtungen stellte Morgenroth (9) fest, dass sich das Neurotoxin in dem Verhalten thermischen Einflüssen gegenüber durchaus dem Hämolysin des Cobragiftes im Prinzip anschliesst. Während bei neutraler Reaktion eine halbe respektiv 1 Stunde auf 100° erhitzte Giftlösungen auf $^1/_8$ des ursprünglichen Giftgehaltes abgeschwächt waren, blieb nach 1-stündigem Erhitzen in kochendem Wasserbade bei saurer Reaktion die tötliche Dosis die gleiche. Es genügte schon ein ausserordentlich geringer HCl-Gehalt der Lösung, um das Neurotoxin thermostabil zu erhalten. Mit einem Gehalt von n/10000 HCl war die untere Grenze noch nicht erreicht.

In Bestätigung der Versuche von Kyes am Cobrahämolysin konnte Morgenroth zeigen, dass bei einem Gehalt von $^n/_{10}$ HCl $^1/_2$-stündiges Erhitzen in kochendem Wasserbad keine Abschwächung hervorbringt. Er benutzte diese Resistenz um das Toxin aus seiner Antitoxinverbindung wieder zu gewinnen. Es zeigte sich nämlich auf einem Wege der hier nicht näher beschrieben werden kann, dass der Zusatz von Säure die Verbindung des Cobrahämolysins mit seinem spezifischen Antitoxin wieder aufhebt, und dass das abgespaltene Antitoxin durch Erhitzen in saurer Lösung vollständig zerstört werden kann, während das Toxin erhalten bleibt. Das Verhalten des Toxins in saurer Lösung dem Antitoxin gegenüber ist von besonderem Interesse, da es im Verein mit der Thermostabilitat eine eingreifende Veränderung in dem Toxinmolekül anzeigt.

Eine besondere Besprechung der Beobachtung von Kyes, dass das Hämolysin des Cobragiftes durch halbstündiges Erhitzen auf 100° gar nicht geschädigt, durch 2-stündiges

Erhitzen jedoch vollständig zerstört wird, erscheint für notwendig. Schon Morgenroth und Pane (10) haben darauf aufmerksam gemacht, dass diese Beobachtung auf besondere Verhältnisse hinweisen muss, da ein derartiger Sprung durchaus nicht den allmählichen Verlauf der gewöhnlichen Giftabschwächung entspreche. Offenbar — und dies tritt auf diesem Gebiete für die ganze Versuchsanordnung und für die Bewertung der Versuchsresultate als ein besonders erschwerendes Moment hinzu — sind wir über die Bedingungen, welche bei der thermischen Beeinflussung dieser Giftlösungen in Frage kommen, lange nicht genügend im Klaren. Ein besonderes Augenmerk ist vor Allem auf ein eigenartiges Verhalten des Cobrahämolysins zu richten, das zuerst von Morgenroth und Pane beschrieben, allerdings in seinen Bedingungen nichts weniger als vollständig definiert worden ist. Es zeigte sich nämlich in einer Anzahl von Fällen, dass unmittelbar nach dem Erhitzen saurer Giftlösungen die hämolytische Wirkung desselben eine erhebliche Einbusse erlitten hatte, während nach längerem Stehen der neutralen Lösung die hämolytische Wirkung mehr oder weniger vollständig wiederkehrte. Es liegt offenbar die „Umwandlung des Giftes in eine ungiftige Modifikation und die Rückbildung derselben nach Herstellung der ursprünglichen Verhältnisse“ vor. Es ist klar, dass bei Versuchen, welche das Verhalten des Cobragiftes gegenüber thermischen Einflüssen feststellen sollen, auf diese Beobachtungen besondere Rücksicht zu nehmen ist. Für die Beurteilung von Beobachtungen welche für eine Thermostabilität unter bestimmten Verhältnissen sprechen, kommen dieselben allerdings nicht in Betracht, wohl aber müssen Phänomene der Giftzerstörung durch Einwirkung höherer Temperatur mit aller Vorsicht beurteilt werden. Die Prüfung der Toxicität unmittelbar nach dem Erhitzen darf nicht als endgültiges Mass der Abschwächung angenommen werden, sondern es muss eine erneute Prüfung nach längerem Ver-

weilen der Lösung unter den ursprünglichen Bedingungen zur Grundlage der Beurteilung genommen werden.

Nachdem durch die vorgehenden Versuche ausschliesslich die Thermostabilität der Cobragifte, wie sie durch die Einwirkung der Salzsäure hervorgebracht wird, festgestellt war, erschien es als der erste Schritt, um weitere Einblicke in diesem eigentümlichen Vorgang zu erhalten, die Bedeutung der Säurekonzentration für das Zustandekommen der Stabilisierung festzustellen und zugleich zu untersuchen, wie sich die Säuren verschiedener Stärke und chemischer Konstitution in dieser Hinsicht verhalten. Die folgenden Experimente können selbstverständlich eine erschöpfende Behandlung der Frage nicht darstellen, sind aber wohl imstande zu einer etwas eingehender Kenntnis der hier in Frage kommenden Erscheinungen beizutragen.

Zuerst wurden Versuche ausgeführt mit Zusatz von Salzsäure in verschiedenen Konzentrationen.

In der Versuchstechnik habe ich mich in allen wesentlichen Punkten an Kyes angeschlossen. Vom Cobragift* diente zu allen Versuchen eine 1 % Stammlösung in gleichen Teilen Glycerin und physiol. Kochsalzlösung. Von dieser Stammlösung wurden Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Diese Giftlösungen wurden im Eisschrank bei 6—8° aufbewahrt, die Stammlösung ausserdem vor Licht geschützt. Das Lecithin (Agfa) wurde 5 % in Methylalkohol gelöst und zu jedem Versuche frisch mit physiologischer Kochsalzlösung entsprechend (1 : 100) verdünnt. Das zur Hämolyse verwendete Blut wurde aus der Ohrvene des Kaninchens entnommen, davon eine 5-prozentige Suspension in physiol. Kochsalzlösung hergestellt, diese zweimal zentrifugiert und

---

* Herrn Prof. Calmette, Direktor des Institut Pasteur Lille, der uns das wertvolle Material an Cobragift freundlichst überlassen hat, sei an dieser Stelle bester Dank gesagt

dekantiert, damit das Blut durch solches zweimaliges Waschen von der Hauptmenge des sonst störenden Serums befreit werde. Die Versuchsreihe wurde so hergestellt. Zuerst kamen in jedes Reagensröhrchen entsprechende Mengen physiol. Kochsalzlösung zum Ausgleich des Volumens; dann absteigende Menge des Cobragiftes bis O Cobragift; nachdem in sämtlichen Röhrchen ca. 0,1 ccm des 5-proz. Lecithins $^1/_{100}$ zugefügt wurde, wobei als Kontrolle ein Röhrchen ohne Cobragift weder Lecithin (00) galt, brachte man in jedes Röhrchen 1 ccm der 5-proz. Blutaufschwemmung. Alles kam in den Blutschrank (37^0), blieb dort unter öfterem Schütteln ca. 2 Stunden, und dann bis zur endgiltigen Beobachtung am nächsten Morgen im Eisschrank (bei 6—8^0), wo eine vollkommene Sedimentierung der noch intakten Blutkörperchen stattfindet. Die quantitave Bestimmung der Hämolyse wird folgendermassen ausgeführt (8). Die beiden Fundamentalpunkte, die vollständige Hämolyse (komplett), und das Ausbleiben derselben (0), sind meist ausserordentlich scharf zu erkennen. Dann gibt es fast komplette Hämolyse, auch als „Schleier" bezeichnet, wo beim Aufschütteln sich nur ein leises Wölkchen hervorhebt; dann unterscheiden wir eine sehr starke Hämolyse, wo wenig Sediment, aber stark lackfarbene Lösung zu sehen ist, starke Hämolyse, mässig starke, wenig, sehr wenig — nach der Farbe der oben stehenden Flüssigkeit. Als Spur bezeichnen wir das Auftreten einer geringen, bei sanftem Bewegen des Reagensröhrchens erkennbaren Lösungszone dicht oberhalb der Kuppe; noch kleinere Grade der Hämolyse bezeichnen wir als Spürchen, um endlich dicht vor der Null-Grenze das kaum sichtbare Gelbwerden der Flüssigkeit als gelb, gelblich zu bezeichnen.

Die Versuche mit der Einwirkung der Salzsäure wurden folgendermassen eingestellt: Zu gleichen Mengen von Cobragift $^1/_{100}$ wurden verschiedene Mengen Salzsäure zugefügt; in einer Reihe Kontrollversuche blieb das Cobragift ohne HCl-

Zusatz; die so hergestellten Gemische wurden in Jenaer Reagenzgläsern mit ca. 25 cm. langem Steigrohr (um Verdunsten der Flüssigkeit zu verhindern) im Wasserbade bei 100° ursprünglich 1 Stunde lang gekocht, nachdem sorgfältig abgekühlt, mit NaOH von entsprechender Konzentration neutralisiert (gegen Lackmuspapier, resp. Neutralrotlösung) und mit Lecithin auf Hämolyse geprüft; zum Vergleich wurde jedesmal auch eine Versuchsreihe mit Cobragift ungekocht aufgestellt, um die eventuelle Abschwächung resp. Zerstörung der Giftwirksamkeit festzustellen, resp. nach der oben besprochenen Benennungsmethode quantitativ zu messen. Hier eine Versuchstabelle:

Cobragift $^1/_{100}$ 4,0 ccm:
A) + 0,1 $^n/_1$ HCl (entspricht d. Konzentr. $^n/_{41}$)
B) + 0,5 $^n/_{10}$ HCl (= $^n/_{90}$)
C) + 0,5 $^n/_{100}$ HCl (= $^n/_{900}$)
D) — ohne Säurezusatz.

Alles eine Stunde lang mit Steigrohr im Wasserbade gekocht, nachdem gekühlt, neutralisiert.

Contr. — Cobragift ungekocht
Kaninchenblut 5 % 1,0 ccm
Lecithin 5 % $^1/_{100}$ 0,1 ccm.

	A	B	C	D	Con.
1) 1,0 $^1/_{100}$	komplett	komplett	komplett	f.kmpl.	komplett
2) 0,5	„	„	„	stark	„
3) 0,25	„	fast komplett	sehr stark	mäss.	„
4) 1,0 $^1/_{1000}$	stark	stark	stark	wenig	fast komplett
5) 0,5	„	„	„	Spur	sehr stark
6) 0,25	wenig	mässig	mässig	„	ziemlich stark
7) 0,1	„	„	wenig	„	wenig
8) 0	0	0	0	0	0
9) 00	0	0	0	0	0

Es stellte sich also heraus, dass Cobragift nach einstündigem Kochen im Gegensatz zu den Angaben von Kyes und Sachs nicht zerzört wird, sondern nur eine Abschwächung erfährt, die aber nicht mehr als das zehnfache der ursprünglichen Wirksamkeit beträgt. Da aber die Schutzwirkung der Säure dann erst quantitativ zu messen ist, wenn sie unter den Bedingungen festgestellt ist, bei denen das Cobragift allein der Zerstörung unterliegt, so änderte ich den Versuch in dieser Weise, dass ich anstatt eine Stunde zwei Stunden kochte; um deutlichere Unterschiede zu erhalten, nahm ich in weiteren Versuchsreihen anstatt der Verdünnung 1:100 die Verdünnung 1:10. Es galt jetzt die relative Abschwächung der Giftwirksamkeit nach Behandlung mit Salzsäure verschiedener Konzentration zu beobachten, um daraus die schützende Wirkung als abhängig von der Konzentration der Säure festzustellen, und zuletzt die Grenze der Konzentration festzustellen, bei welcher die schützende Wirkung eben aufhört. Ich lasse nun einige Versuchstabellen folgen:

Cobragift $^1/_{10}$ 5,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_1$ HCl (= ca. $^n/_{18}$)
B) + 0,3 $^n/_{10}$ HCl (= ca. $^n/_{180}$)
C) + 0,6 $^n/_{100}$ HCl (= ca. $^n/_{900}$)
D) + 1,0 $^n/_{1000}$ HCl (= ca. $^n/_{6000}$)
E) — ohne Säurezusatz.

2 Stunden lang im Wasserbade mit Steigrohr gekocht, dann abgekühlt und mit NaOH neutralisiert.

Contr.: Cobragift ungekocht.
Kaninchenbl. wie oben.
Lecithin wie oben.

	A	B	C	D	E	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	stark	wenig	sehr wen.	komplett
2) 0,5	„	„	„	gelblich	„	„
3) 0,25	„	„	sehr wen.	„	Spürchen	„

		A	B	C	D	E	Contr.
4) 1,0	$^1/_{100}$	f. kompl.	kompl.	min. Spch.	komplett	gelblich	komplett
5) 0,5		stark	„	„	„	„	„
6) 0,25		mässig	stark	„	„	„	„
7) 1,0	$^1/_{1000}$	„	gelblich	„	„	„	Schleier
8) 0,5		„	„	„	„	„	sehr stark
9) 0,25		min. Spch.	„	gelblich	„	„	„
10) 0,1		gelblich	„	„	„	„	zieml. strk.
11) 0		0	0	0	0	0	0
12) 00		0	0	0	0	0	0

Aus dieser Versuchsreihe ist zu ersehen, dass:

1) bei der Konzentration $n/_{18}$ HCl wird das Gift auf $^1/_{10}$ der ursprünglichen Wirksamkeit abgeschwächt; bei Zufügung von HCl der Konzentration $n/_{180}$ entsprechend erzielen wir eine noch grössere Schutzwirkung — Abschwächung bis auf $^1/_2$ des ursprünglichen Wertes; bei Konzentration von $n/_{900}$ beobachten wir einen minimalen Schutz — Abschwächung auf ungefähr $^1/_{100}$ der anfänglichen Wirksamkeit; bei der Konzentration $n/_{6000}$ gar keine Schutzwirkung — die Spur von hämolytischer Wirkung entspricht dem Grade der Wirkung des ohne Säurezusatz gekochten Giftes, der noch nach zweistündigem Kochen erhalten bleibt;
2) es scheint ein Optimum der Schutzwirkung zu geben, das ungefähr der Konzentration $n/_{180}$ der zugefügten Salzzsäure entspricht;
3) die Grenze der Schutzwirkung liegt ungefähr bei $n/_{900}$ HCl.

Weitere Versuchsreihen haben innerhalb der Grenzen zwischen Optimum = $n/_{180}$ und Minimum = $n/_{900}$ ein Absteigen der Schutzwirkung bewiesen, was aus folgenden Tabellen ersichtlich ist:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm
A) + 0,3 $^n/_{60}$ HCl (= $^n/_{660}$)
B) — ohne Säurezusatz.

2 Stunden im Wasserbade u. s. w.

Contr.: Cobragift ungekocht.

Kbl. wie oben

Lct. wie oben.

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spur	komplett
2) 0,5	komplett	Spürchen	komplett
3) 0,25	komplett	gelbl.	komplett
4) 1,0 $^1/_{100}$	komplett	„	komplett
5) 0,5	komplett	„	komplett
6) 0,25	fast komplett	„	komplett
7) 1,0 $^1/_{1000}$	sehr stark	„	komplett
8) 0,5	ziemlich stark	„	fast komplett
9) 0,25	wenig	„	fast komplett
10) 0,1	Spur	0	Spur
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Der Konzentration $^n/_{660}$ HCl entspricht eine Abschwächung der Giftwirkung auf $^1/_5$.

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm

A) + 0,3 $^n/_{70}$ HCl (= $^n/_{770}$)

B) — ohne Säurezusatz.

2 St. gekocht im Wasserbade u. s. w.

Contr. — Cobragift ungekocht.

Kbl. wie oben

Lct. wie oben.

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spur	komplett
2) 0,5	komplett	Spürchen	komplett
3) 0,25	komplett	gelbl.	komplett
4) 1,0 $^1/_{100}$	sehr stark	„	komplett
5) 0,5	ziemlich stark	„	komplett
6) 0,25	Spur	„	komplett
7) 1,0 $^1/_{1000}$	Spur	„	stark
8) 0,5	Spur	„	sehr wenig

	A	B	Contr.
9) 0,25	gelbl.	gelbl.	sehr wenig
10) 0,1	»	»	Spürchen
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Bei Zusatz von Säure entsprechend der Konzentration n_{770} sinkt der Wert der Schutzwirkung bis auf die 10fache Abschwächung.

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_{80}$ HCl (= $^n/_{880}$),
B) — ohne Säure,
gekocht wie oben u. s. w.
Contr. — Cobragift ungekocht.
Kaninchenblut 5 % 1,0 ccm
5 % Lecithin $^1/_{100}$ 0,1 ccm.

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	fast komplett	Spürchen	komplett
2) 0,5	fast komplett	Spürchen	komplett
3) 0,25	fast komplett	gelbl.	komplett
4) 1,0 $^1/_{100}$	ziemlich stark	gelbl.	komplett
5) 0,5	wenig	gelbl.	komplett
6) 0,25	Spur	gelbl.	komplett
7) 1,0 $^1/_{1000}$	gelbl.	0	komplett
8) 0,5	gelbl.	0	stark
9) 0,25	0	0	ziemlich stark
10) 0,1	0	0	Spürchen
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Von n_{770} bis n_{880}, also in der Nähe der Minimumgrenze, sinkt der Wert der Schutzwirkung erheblich: während bei n_{770} nur eine 10fache Abschwächung zu beobachten ist, können wir bei Zusatz von Säure zu der Konzentration n_{880} überhaupt keine komplette Lösung feststellen; nach dem

schwächeren Grade der Hämolyse berechnet, beträgt die Wirkung des mit Zusatz von $n/_{880}$ HCl gekochten Giftes das ca. $^1/_{50}$ der ursprünglichen Wirkung. Wir sehen also, dass in den Optimum-Minimumgrenzen die Schutzwirkung sich im Verhältnis zur Konzentration der zugefügten Chlorwasserstoffsäure ändert.

Es galt nun festzustellen, ob die Schutzwirkung auf Bildung eines spezifischen Chlorats beruht, oder ob auch andere Salzmodifikationen des Cobrahämolysins thermostabile Eigenschaften besitzen; eventuell ob im Falle einer stereochemischen Umlagerung des Giftmoleküls die Art der Anionen einen Einfluss auf diesen Prozess habe.

Von den anorganischen Säuren verwendete ich zu meinen Versuchen eine der schwächsten Säuren, die Borsäure H_3BO_3 (Molekulargewicht = 62, also normale Lösung Ich nahm jedesmal 3,0 ccm einer $^1/_{10}$-Lösung von Cobragift und fügte zu:

A) + 0,3 $^n/_1$ H_3BO_3 (= $^n/_{11}$)
B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) + 0,3 $^n/_{60}$ „ (= $^n/_{660}$)
D) — ohne Zusatz von Säure;

das Alles wurde, wie immer, 2 Stunden lang in Jenaer Reagenzgläsern mit Steigrohr im Wasserbade bei 100° gekocht, nachdem abgekühlt und mit NaOH neutralisiert.

Contr. — Cobragift ungekocht.

Die Versuchsreihe gab folgende Resultate:

	A	B	C	D	Con.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spur	min. Spch.	Spur	komplett
2) 0,5	komplett	Spur	min. Spch.	Spur	komplett
3) 0,25	komplett	Spürchen	0	Spur	komplett
4) 1,0 $^1/_{100}$	komplett	Spürchen	0	Spch.	komplett

	A	B	C	D	Con.
5) 0,5	komplett	min. Spch.	0	0	komplett
6) 0,25	komplett	0	0	0	komplett
7) 1,0 $^1/_{1000}$	fast komplett	0	0	0	fast komplett
8) 0,5	stark	0	0	0	fast komplett
9) 0,25	zieml. stark	0	0	0	stark
10) 0,1	zieml. stark	0	0	0	sehr wenig
11) 0	0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0	0

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, dass bei der Konzentration $^n/_{11}$ eine absolute Schutzwirkung zustande kommt (gar keine Abschwächung); dafür liegt die Minimumgrenze sehr hoch, — schon bei $^n/_{220}$ gibt es keine Schutzwirkung mehr, bei $^n/_{660}$ sogar eine abschwächende Wirkung gegenüber dem ohne Säure gekochten Cobragifte. Die Borsäure (H_3BO_3) übt im Vergleich mit Salzsäure in engeren Grenzen eine intensivere Schutzwirkung aus, die überhaupt die Wirkung aller anderen von mir geprüften Säuren übertrifft.

Aus der Reihe der organischen Säuren wurde zuerst die Oxalsäure COOH-COOH geprüft (Molekulargewicht = 90, normale Lösung = 9 %). Von dieser hatte ich eine $^n/_2$-Lösung zur Verfügung. Hier einige Versuchstabellen mit dieser Säure:

Cobragift $^1/_{10}$ 4,0 ccm.
A) + 0,4 $^n/_2$ $(COOH)_2$ (= $^n/_{22}$)
B) + 0,4 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) — ohne Säure
2 Stunden gekocht usw.
Contr.-Cobragift ungekocht.
KBl. wie oben.
Lct. „ „

	A	B	C (*)	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	komplett	komplett
2) 0,5	„	„	„	„
3) 0,25	„	„	„	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	Schleier	„	fast komplett	„
5) 0,5	„	„	„	„
6) 0,25	stark	stark	stark	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	zieml. stark	zieml. stark	zieml. stark	„
8) 0,5	„	„	„	Schleier
9) 0,25	„	Spürchen	mässig	fast komplett
10) 0,1	gelblich	„	Spürchen	sehr stark
11) 0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0

---

* Dieser Versuch gab mir Veranlassung in einigen weiteren Versuchsreihen die Reaktion des Mediums vor, respektive während oder nach dem Kochen zu prüfen. Zu dieser Modifikation der Methode veranlasste mich die Versuchsreihe C. Hier zeigte sich nämlich eine nur geringe Abschwächung der Giftwirkung, obgleich diese Versuchsreihe ohne Zusatz von Säure aufgestellt wurde. Da wir nach 2-stündigem Kochen eine fast totale Zerstörung der Giftwirksamkeit zu beobachten gewohnt sind, und die Schutzwirkung auf eventuelle Anwesenheit von Säure beziehen, so wollte ich mittels Reaktionsprüfung kontroliren, ob möglich während des Kochens ein Ansäuern der vorher neutral reagirenden Cobragiftlösung vorkommt. Darum habe ich vor dem Kochen zu der Giftlösung ohne Säurezusatz als Indikator Neutralrot zugefügt — es zeigte sich eine Orangefärbung der Lösung, also neutrale Reaktion; um das hypothetische Ansäuern auszuschalten, habe ich eine zweite Giftlösungportion mit einem Spürchen Natronlaugelösung eben bis zum Umschlagen der Färbung alkalisch gemacht. Es zeigte sich während des Kochens schon, dass die beobachtete Thermostabilität der nicht angesäuerten Giftlösung nicht auf Ansäuern während des Kochens beruhe kann — im Gegenteil, die indikatorische Färbung schlug während des Kochens sogar ins Gelbe — also die Reaktion ins Alkalische um. Da dieses Gelbwerden der Lösung auf einer Zersetzung des Neutralrots bei hoher Temperatur beruhen konnte, hab ich eine Lösung von Neutralrot in Kochsalzlösung gekocht — die schlug auch ins gelbe, die Farbe wurde aber nach Abkühlen wieder orange (neutrale Reaktion), was im Falle der Cobragiftlösung nicht vorkam. Noch mehr, ich prüfte in späteren Fällen die Reaktion der gekochten neutralen Lösung erst nach dem Kochen und Abkühlen — es zeigte sich stets eine schwach alkalische Reaktion der Lösung. Dieses Alkalischwerden beruht war-

Hier eine Versuchstabelle mit Reaktionsprüfung:

3,0 ccm Cobragift $^1/_{10}$:

A) + 0,3 $^n/_2$ Oxalsäure (= $^n/_{22}$)

B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$) — nach dem Kochen erwies sich als alkalisch.

C) — ohne Säurezusatz — während des Kochens in alkalisch umgeschlagen.

D) — vor dem Kochen mit NaOH etwas alkalisch gemacht.

2 Stunden bei 100° im Wasserbade u. s. w.

Contr. — Cobragift ungekocht.

Kbl. wie oben.

Lct. „ „

	A		B	C	D	Contr.
1)	1,0 $^1/_{10}$	komplett	stark	mässig	sehr wenig	komplett
2)	0,5	„	„	„	Spürchen	„
3)	0,25	„	Spch.	wenig	„	„
4)	1,0 $^1/_{100}$	Schleier	„	„	gelblich	„
5)	0,5	sehr stark	gelbl.	gelblich	„	„
6)	0,25	mässig	„	„	„	„
7)	1,0 $^1/_{1000}$	wenig	„	„	„	fast komplett
8)	0,5	sehr wenig	„	„	„	stark
9)	0,25	Spur	„	„	„	„
10)	0,1	gelblich	„	„	„	ziemlich stark
11)	0	„	„	„	„	gelblich
12)	00	0	0	„	0	0

---

scheinlich auf Zersetzung des Glases von Reagensröhrchen. — Was die beobachtete Thermostabilität anbetrifft, so kann sie nicht als allgemeines Gesetz gelten — in einer Mehrzahl der Fälle wurde die Giftlösung ohne Säurezusatz nach 2-stündigem Kochen im Wasserbad doch zerstört; diese Schwankungen beweisen uns nur, dass man die Zeitgrenze der absoluten Hitzewirkung noch nicht mit aller Sicherheit feststellen kann. Eins will ich noch dazu bemerken — im Falle wo die neutrale Giftlösung bei 100° nach 2 Stunden noch nicht zerstört wurde, konnte ich in der minimal alkalisch gemachten Versuchsreihe eine sichere Giftzerstörung nachweisen.

Lecithin allein löst etwas.

Resumé:

1) Cobragift $^1/_{10}$ nach zweistündigem Kochen wohl mehr als 100fach abgeschwächt;
2) Dasselbe, ganz schwach alkalisch gemacht, noch erheblicher abgeschwächt;
3) Mit Oxalsäure schwach angesäuertes — $n/_{220}$ — Cobragift wird nach dem Kochen alkalisch; (Neutralot nachträglich zugesetzt!); in dieser Konzentration übt Oxalsäure nur ganz schwachen Schutz.
4) Oxalsäure in stärkerer Konzentration — $n/_{22}$ — übt deutlichen Schutz: Abschwächung nach zweistündigem Kochen nur bis auf $^1/_{10}$.

Während das Optimum für die Schutzwirkung in weiteren Versuchen sich bestätigte, konnte ich im Gegenteil den Wert für das Minimum viel niedriger stellen — was aus folgender Tabelle zu ersehen ist:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm.
A) + 0,3 $^n/_{60}$ $(COOH)_2$ (= $^n/_{660}$)
B) + 0,3 $^n/_{80}$ „ (= $^n/_{880}$)
gekocht usw. wie oben.
Contr.-Cobragift ungekocht.
Kchbt. wie oben
Lct. „ „

		A	B	C	Contr.
1)	1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spur	Spur	komplett
2)	0,5	„	Spürchen	Spürchen	„
3)	0,25	„	gelbl.	gelblich	„
4)	1,0 $^1/_{100}$	„	„	„	„
5)	0,5	sehr stark	„	„	„
6)	0,25	stark	„	„	„
7)	1,0 $^1/_{1000}$	„	„	„	„
8)	0,5	„	„	„	fast komplett
9)	0,25	wenig	„	„	„
10)	0,1	gelblich	„	„	Spur
11)	0	0	0	0	0
12)	00	0	0	0	0

Bei Konzentration $n/_{660}$ ergibt sich eine Abschwächung nur bis $^1/_{10}$ der ursprünglichen Wirkung, also noch eine nicht geringe Schutzwirkung. Erst bei $n/_{880}$ hört die Schutzwirkung der Oxalsäure auf — also entsprechend der Minimalkonzentration bei Salzsäure.

Nachdem wir gesehen haben, dass Oxalsäure sich qualitativ wie quantitativ ganz ähnlich wie die Salzsäure verhält, wollte ich an der Reihe der organischen Säuren eine Oxysäure mit einem Hydroxyl, die Milchsäure v. Oxypropionsäure $CH_3 . CHOH . COOH$, und eine mit 2 Hydroxylen, die Weinsäure v. Dioxybernsteinsäure COOH . CHOH . CHOH . COOH prüfen.

Versuch mit Milchsäure (Oxypropions).

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm.
A) + 0,3 $^n/_1$ Milchsäure (= $^n/_{11}$)
B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) + 0,3 $^n/_{60}$ „ (= $^n/_{660}$)
D) — ohne Säurezusatz.

Alles im Wasserbade bei 100° 2 Std. gekocht, usw.
Contr.-Cobragift ungekocht.
Kchbl. wie oben.
Lct. „ „

		A	B	C	D	Cont.
1)	1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	komplett	min. Spch.	komplett
2)	0,5	„	„	„	min. Spch.	„
3)	0,25	„	„	„	gelblich	„
4)	1,0 $^1/_{100}$	„	„	„	„	„
5)	0,5	„	stark	stark	„	„
6)	0,25	stark	zieml. stark	zieml. stark	„	„
7)	1,0 $^1/_{1000}$	zieml, stark	„	„	„	„
8)	0,5	„	sehr wenig	mässig	„	f. kompl.
9)	0,25	wenig	Spur	sehr wenig	„	„
10)	0,1	gelblich	gelblich	min. Spch.	„	stark
11)	0	„	„	gelblich	„	gelblich
12)	00	0	0	0	0	0

Aus dieser Versuchsreihe ist zu ersehen, dass das Optimum der Schutzwirkung der stärksten Konzentration — $n/_{11}$ Milchsäure — entspricht und gleicht einer fünffachen Abschwächung der Wirksamkeit. Bei $n/_{220}$ ist die Schutzwirkung fast identisch mit $n/_{660}$, nämlich bis auf $^1/_{10}$. Um die Minimumgrenze festzustellen, nehmen wir aus vergleichenden Versuchsreihen die betreffenden Daten heraus:

A entspricht der Konzentration $^n/_{770}$ Milchs.
B „ „ „ $^n/_{880}$ „

	A	Contr. (Cbg. angek.)	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	Spürchen	komplett
2) 0,5	„	„	gelblich	„
3) 0,25	„	„	„	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	sehr stark	„	0	„
5) 0,5	stark	„	0	„
6) 0,25	wenig	„	0	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	Spur	stark	0	„
8) 0,5	„	sehr wenig	0	stark
9) 0,25	Spürchen	„	0	ziemlich stark
10) 0,1	gelblich	Spürchen	0	Spürchen
11) 0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0

Während die Milchsäure bei Konzentration $n/_{770}$ noch eine starke Schutzwirkung (bis auf $^1/_{10}$) ausübt, hört schon bei $n/_{880}$ die Schutzwirkung gänzlich auf. Die Grenze für Milchsäurewirkung liegt dementsprechend zwischen $n/_{770}$ und $n/_{880}$. Die Oxysäure mit einem Hydroxyl zeigt also keinen bedeutenden Unterschied der Oxalsäure gegenüber — nur das Optimum liegt bei der Milchsäure höher, was vielleicht auf Verlangsamung der Jonen zurückzuführen ist.

Die Weinsäure v. Dioxybernsteinsäure COOH .

CHOH . CHOH . COOH (Molekulargewicht = 150, normale Lösung = 15 %) erwies sich als in höchstem Grade schützend wirkende Säure. Hier einige Versuchstabellen:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_1$ $C_4H_6O_6$ (= $^n/_{10}$)
B) + 0,3 $^n/_{10}$ „ (= $^n/_{100}$)
C) — ohne Säure.

Alles 2 Stunden bei 100° u. s. w.
Contr. Cobragift ungekocht
Kchbl. wie oben
Lct. „ „

	A	B	C	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	wenig	komplett
2) 0,5	„	„	„	„
3) 0,25	„	„	Spürchen	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	„	„	„
5) 0,5	stark	„	„	„
6) 0,25	ziemlich stark	stark	„	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	„	„	„	fast komplett
8) 0,5	wenig	„	„	sehr stark
9) 0,25	sehr wenig	„	„	„
10) 0,1	Spürchen	wenig	„	ziemlich stark
11) 0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_1$ Weinsäure (= $^n/_{11}$)
B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) — ohne Zusatz von Säure.

2 Stunden lang im Wasserbade gekocht, usw.
Contr.: — Cobragift ungekocht.
Kbl. wie oben.
Lct. „ „

	A	B	C	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	wenig	komplett
2) 0,5	„	„	sehr wenig	„
3) 0,25	„	„	gelblich	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	„	„	„
5) 0,5	stark	stark	„	„
6) 0,25	„	„	„	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	zieml. stark	zieml. stark	„	Schleier
8) 0,5	wenig	sehr wenig	„	„
9) 0,25	sehr wenig	min. Spürchen	„	sehr stark
10) 0,1	Spürchen	gelblich	0	stark
11) 0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0

1) Bei Zufügung von Weinsäure entsprechend der Konzentration $^n/_{11}$ besteht eine Schutzwirkung bis auf $^1/_4$;
2) bei der Konzentration $^n/_{110}$ Schutz sogar bis auf $^1/_2$ — Optimum der Schutzwirkung;
3) bei weiterer Verdünnung — $^n/_{220}$ — sinkt der Schutzwert wieder bis auf $^1/_4$.

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 cmm:
A) + 0,3 $^n/_1$ Weinsäure (= $^n/_{11}$)
B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) + 0,3 $^n/_{80}$ „ (= $^n/_{880}$)
D) — ohne Säure.

Alles 2 Stunden lang gekocht u. s. w.

Contr.: Cobragift ungekocht.

Kchbl. 5 % 1,0 ccm.
5 % Lct. $^1/_{100}$ 0,1 ccm.

	A	B	C	D	Cont.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	komplett	Spur	komplett
2) 0,5	„	„	„	Spürchen	„
3) 0,25	„	„	„	gelblich	„
4) 1.0 $^0/_{100}$	„	„	„	„	„
5) 0,5	Schleier	„	„	„	„

	A	B	C	D	Cont.
6) 0,25	Schleier	Schleier	Schleier	gelblich	komplett
7) 1,0 $^1/_{1000}$	stark	„	fast komplett	„	„
8) 0,5	„	zieml. stark	stark	„	„
9) 0,25	zieml. stark	„	„	„	Schleier
10) 0,1	wenig	„	zieml. stark	„	stark
11) 0	gelblich	gelblich	gelblich	„	gelblich
12) 00	0	0	0	0	0

In diesem Versuche fällt uns eine etwas grössere Abschwächung bei $^n/_{11}$ und $^n/_{220}$ gegenüber den früheren Versuchstabellen auf — vielleicht auf die störende Wirkung des Lecithins allein (Reihe XI) zu beziehen. Was aber besonders auffallend ist, ist die bedeutende Schutzwirkung der Weinsäure bei relativ geringer Konzentration — $^n/_{880}$ übt noch starken Schutz aus, hier nicht geringer, als die Konzentration $^n/_{220}$, nämlich Abschwächung nur bis auf $^1/_{10}$. Noch mehr, die Weinsäure übt bei Konzentration $^n/_{1100}$ einen bedeutenden Schutz, was eine andere Versuchstabelle zeigt:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_{110}$ Weinsäure (= $^n/_{1100}$)
B) — ohne Säure
gekocht 2 Stunden im Wasserbade u. s. w.
Contr. — Cobragift ungekocht.
KBl. wie oben
Lct. „ „

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spürchen	komplett
2) 0,5	„	„	„
3) 0,25	„	„	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	min. Spürchen	„
5) 0,5	ziemlich stark	gelblich	„
6) 0,25	„	„	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	wenig	„	„
8) 0,5	gelblich	„	f. k.—k.
9) 0,25	„	„	f. k.
10) 0,1	„	„	sehr stark
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Weinsäure übt in Konzentration $n/_{1100}$ noch eine erhebliche Schutzwirkung aus — Abschwächung ungefähr bis auf $^1/_{10}$. Bei anderen geprüften Säuren hört die Schutzentwicklung viel früher auf — höchstens bei ca. $n/_{900}$. Möglich handelt es sich in diesem Falle um Bildung eines spezifisch resistenten weinsauren Salzes.

Wir sehen aus diesen Versuchen, dass die Oxysäuren in Vergleich mit nicht hydroxylierten organischen Säuren keine Verminderung der Schutzwirkung aufweisen— im Gegenteil, was die Weinsäure anbetrifft, so besitzt diese einen sehr hohen Grad des Stabilisierungsvermögens. Dann galt es die Wirkung der Aminosäuren, also solcher organischer Säuren, in denen die H-Atome durch NH_2-Gruppe vertauscht sind, zu prüfen. Zuerst prüfte ich das Alanin, die a-Aminopropionsäure $CH_3CH(NH_2).COOH$. Diese zeigte eine nur bei höherer Konzentration deutliche Schutzwirkung — analog mit der Borsäure, obgleich nicht in so hohem Grade wie diese (nur bis auf $^1/_4$, — Borsäure absoluten Schutz):

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_1$ Alanin (= $^n/_{11}$)
B) + 0,3 $^n/_{20}$ „ (= $^n/_{220}$)
C) + 0,3 $^n/_{60}$ „ (= $^n/_{660}$)
D) — ohne Zusatz von Säure,
das alles 2 Stunden bei 100° gekocht u. s. w.
Contr. — Cobragift ungekocht.
Kchbl. wie oben
Lct. „ „

	A	B	C	D	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spürchen	Spürchen	Spürchen	komplett
2) 0,5	„	„	„	gelbl.	„
3) 0,25	„	min, Spürchen	gelbl.	„	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	gelblich	„	0	„
5) 0,5	Schleier	„	„	0	„
6) 0,25	stark	„	„	0	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	wenig	„	„	0	f. k.

	A	B	C	D	Contr.
8) 0,5	sehr wenig	gelblich	0	0	z. st.
9) 0,25	gelbl.	„	0	0	s. w.
10) 0,1	0	0	0	0	Spch.
11) 0	0	0	0	0	0
12) 0	0	0	0	0	0

Bei $n/_{11}$ Schutzwirkung bis auf $^1/_4$ der ursprünglichen Wirksamkeit, bei $n/_{220}$ schon keine Schutzwirkung.

Anders verhält sich eine andere Aminosäure, die Asparaginsäure, Aminobernsteinsäure $COOH . CH_2 . CH (NH_2). COOH$, wie aus folgenden Versuchen zu ersehen ist:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 1,0 $^n/_{10}$ Asparaginsäure (= $^n/_{40}$)
B) + 1,0 $^n/_{50}$ „ (= $^n/_{200}$)
C) + 1,0 $^n/_{150}$ „ (= $^n/_{600}$)
D) — ohne Säure
gekocht 2 St. im Wasserbade abgekühlt, neutralisirt.
Contr.: Cobragift ungekocht
Kchbl. wie oben.
Lct. „ „

	A	B	C	D	Cont.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	komplett	komplett	Spur	komplett
2) 0,5	„	„	„	Spürchen	„
3) 0,25	„	„	„	„	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	„	„	0	„
5) 0,5	Schleier	„	Schleier	0	„
6) 0,25	stark	Schleier	sehr stark	0	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	zieml. stark	sehr stark	wenig	0	„
8) 0,5	Spürchen	Spürchen	Spürchen	0	„
9) 0,25	gelblich	gelblich	„	0	Schleier
10) 0,1	„	„	„	0	mässig
11) 0	0	0	0	0	0
12) 00	0	0	0	0	0

Bei der Konzentration $n/_{40}$ Abschwächung bis auf $^1/_{10}$ (resp. $^1/_5$); bei $n/_{200}$ das Optimum der Schutzwirkung — sicherer Schutz bis auf $^1/_5$ der ursprünglichen Wirksamkeit; bei $n/_{600}$ Schutzwirkung wie bei $n/_{40}$ — Abschwächung weniger als das 10fache. Da bei $n/_{600}$ noch eine bedeutende Schutzwirkung besteht, so galt die untere Grenze festzustellen; dazu folgende aus grösseren vergleichenden Versuchstabellen:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_{70}$ Asparagins. (= $^n/_{770}$)
B) — ohne Säure
Alles 2 Stunden im Wasserbade usw.
Contr. Cobragift ungekocht.
Kchbl. wie oben
Lct. „ „

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	komplett	Spur	komplett
2) 0,5	„	Spürchen	„
3) 0,25	„	gelblich	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	sehr stark	„	„
5) 0,5	stark	„	„
6) 0,25	wenig	0	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	Spur	0	stark
8) 0,5	Spürchen	0	sehr wenig
9) 0,25	„	0	„
10) 0,1	gelblich	0	Spürchen
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Bei der Konzentration $^n/_{770}$ Abschwächung bis auf $^1/_{10}$.

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
A) + 0,3 $^n/_{80}$ Asparagins. (= $^n/_{880}$)
B) — ohne Zusatz von Säure.
2 Stunden im Wasserbade u. s. w.
Contr.: Cobragift ungekocht
Kchbl. 5 % 1,0 ccm
5 % Lct. $^1/_{100}$ 0,1 ccm.

	A	B	Contr.
1) 1,0 $^1/_{10}$	fast komplett	Spürchen	komplett
2) 0,5	„	„	„
3) 0,25	„	gelbl.	„
4) 1,0 $^1/_{100}$	„	„	„
5) 0,5	sehr wenig	„	„
6) 0,25	Spürchen	0	„
7) 1,0 $^1/_{1000}$	gelbl.	0	„
8) 0,5	„	0	stark
9) 0,25	0	0	z. stark
10) 0,1	0	0	Spürchen
11) 0	0	0	0
12) 00	0	0	0

Bei der Konzentration $^n/_{880}$ also noch eine sichere Schutzwirkung — bei 0,25 ccm $^1/_{10}$ noch eine fast komplette Lösung. Die Schutzwirkung hört aber bald auf, was aus einem an die erst zitierte Versuchsreihe angeschlossenem Versuche zu ersehen ist:

Cobragift $^1/_{10}$ 3,0 ccm:
+ C) 0,3 $^n/_{84}$ Asparaginsäure (= $^n/_{924}$)
2 St. gekocht wie oben.
KBl. 5 % 1,0 ccm.
5 % Lct. $^1/_{100}$ 0,1 ccm.

	C ($^n/_{924}$)
1) 1,0 $^1/_{10}$	Spürchen
2) 0,5	gelblich
3) 0,25	0
4) 1,0 $^1/_{100}$	0
5) 0,5	0
6) 0,25	0
7) 1,0 $^1/_{1000}$	0
8) 0,5	0
9) 0,25	0
10) 0,1	0
11) 0	0
12) 00	0

Die Minimumgrenze für Asparaginsäurewirkung liegt also zwischen $n/_{880}$ und $n/_{924}$ — auf einer Höhe ungefähr mit der unteren Grenze für Salzsäure.

Fassen wir die Resultate unserer Versuche zusammen, so können wir die Substanzen, welche wir untersucht haben, in drei Gruppen einteilen. Bei der ersten Gruppe, welcher die Salzsäure, Oxalsäure, Milchsäure und Asparaginsäure angehören, finden wir ein im Wesentlichen gleichartiges Verhalten. Das Optimum liegt bei einer Konzentration von $n/_{100}$—$n/_{200}$ (für Milchsäure bei $n/_{10}$), geringere Konzentrationen üben immer weniger Schutzwirkung aus, bis endlich bei einer Konzentration von $n/_{880}$—$n/_{924}$ die Schutzwirkung ihr Minimum erreicht event. aufhört.

Der zweiten Gruppe gehören die Borsäure und das Alanin an. Hier schützt nur eine sehr hohe Konzentration von etwa $n/_{10}$.

Endlich haben wir als Repräsentantin einer dritten Gruppe die Weinsäure, welche in allen untersuchten Konzentration von $n/_{11}$ bis $n/_{1100}$ eine gleich hohe Schutzwirkung ausübt, vielleicht mit Optimum bei $n/_{110}$.

Hier die Dissoziationscoëfficienten einiger der geprüften Säuren; $\alpha =$

für HCl	= 0,90	
Borsäure	= 0,00	(Nichtleiter)
Oxalsäure	= 0,25	
Weinsäure	= 0,06	
Milchsäure	= 0,03	

Es ist nun die erste Frage, ob sich aus diesen Versuchen direkte Beziehungen zwischen der Stärke der Säuren und deren Schutzwirkungen ergeben. Erschiene die Schutzwirkung als eine direkte Funktion der Stärke der Säuren, lo läge Grund vor, die Verhinderung der Abschwächung auf die

Wirkung der H-Ionen zu beziehen, um diese etwa als eine Art negativer Katalyse zu betrachten. Darum aber kann es sich nach den vorliegenden Resultaten kaum handeln. Wir sehen zwar, dass eine sehr schwache Säure, die Borsäure, nur bei hohen Konzentrationen Schutzwirkung ausübt, aber eine andere schwache Säure, die Weinsäure, schützt noch in den niedrigsten angewandten Konzentrationen ausgibig. Ferner verhalten sich Säuren, die weit schwächer sind als die Salzsäure, im Wesentlichen wie diese. Wir müssen deshalb zu dem für die Auffassung dieser Vorgänge wichtigen Schlusse gelangen, dass der chemischen Konstitution der in Frage kommenden Säuren eine ausschlaggebende Rolle zukommt, und dies wiederum spricht zugunsten der meist von Kyes und Sachs geäusserten Auffassung, dass eine Salzbildung vorliegt, deren basische Komponente das Cobragift bildet. Wir hätten da Salze des Giftes zu unterscheiden, denen ein verschiedener Grad von Thermortabitität zukommt.

Für die Versuchstechnik dürfte aus unseren Versuchen das Ergebnis zu ziehen sein, dass es am zweckmäsigsten sei, zur Stabilisierung des Cobragiftes sich geringer Konzentrationen von Weinsäure zu bedienen.

Zum Schluss sei mir gestattet, Herrn Prof. Morgenroth für die Ueberlassung des Themas und die tatkräftige Unterstützung bei seiner Ausführung meinen besten Dank auszusprechen.

Literatur.

1. Flexner und Noguchi: Snake venom in Relation to Haemolysis, Bakteriolysis and Toxicity (Journal of experim. med. Vol. VI. No. 3, 1902)
2. Jacoby: Hofmeisters Beiträge Bd. I
3. Kyes: Ueber die Wirkungsweise des Cobragiftes (Berl. kl. Wochenschrift 1902 No. 38—39)
4. Kyes und Sachs: Zur Kenntnis der Cobragift aktivierenden Substanzen (B. kl. W. 1903 No. 2—4)
5. Kyes: Ueber die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden (B. kl. W. 1903 No. 42—43)
6. Lamb: Scientific Memoirs Medical and Sanitary Depts. Gov. of India 1903 No. 3
7. Morgenroth: Methodik der Hämolysinuntersuchung (Ehrlichs Gesammelte Arbeiten 1904 S. 461)
8. Morgenroth: Ueber die Wiedergewinnung von Toxin aus seiner Antitoxinverbindung (B. kl. W. 1905 No. 50)
9. Morgenroth: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Schlangengifte und ihrer Antitoxine (Arbeiten aus dem Pathol. Inst. zu Berlin 1906)
10. Morgenroth und Pane: Ueber Beobachtungen reversilber Veränderungen an Toxinen (Biochemische Zeitschrift Bd. I. Heft 4. 1906)
11. Morgenroth und Rosenthal: Zur Kenntnis der Toxinmodifikationen (Bioch. Zeitschr. Bd. II. S. 383).

Thesen.

I.

Alle Cytotoxine des Blutserums, gleichgültig ob sie normalerweise im Blute vorhanden oder immunisatorisch erzeugt sind, bestehen aus zwei Komponenten: dem stabileren Ambozeptor und dem in der Regel labilen Komplement.

II.

Das in den Blutkörperchen vorhandene „Endokomplement" für das Cobragift ist nichts anderes, als das disponible Lecithin der Stromata.

III.

Die stabilisierende Wirkung der Säuren auf Cobragift beruht wahrscheinlich auf Bildung eines Salzes.

Lebenslauf.

Ich, Arnold Eisenmann, mosaischer Konfession, bin im Jahre 1877 in Warschau als Sohn Heinrichs und Annas, geb. Gordon, geboren. Wissenschaftliche Vorbildung habe ich in den klassischen Gymnasien in Warschau und Plozk erhalten. Im Jahre 1897 bezog ich die Warschauer Universität, wo ich auch im Jahre 1903 mit einer Dissertation „Ueber die Häutungsdrüsen bei Raupen von Hyponomeuta" zum Doctor rerum naturalium promovierte. Im Herbst 1903 wurde ich auf Grund meiner naturwissenschaftlichen Studien und nach Ablegung einer Ergänzungsprüfung in Anatomie zum Studium im V. Semester der Medizin zugelassen und hörte die dazu gehörenden Vorlesungen während zwei Semestern 1903|04. Ostern 1905 wurde ich an der Universität Berlin, immatrikuliert, wo ich bis jetzt studierte. Während meiner Studienzeit in Berlin besuchte ich die Vorlesungen, Kliniken und Kurse bei folgenden Herren: v. Bergmann (†), Bumm, Engelmann, Grawitz, Greef, Henkel, Heubner, Hildebrand, Lesser, Meyer, Morgenroth, Nagel, Olshausen, Rubner, Senator, Waldeyer, Wassermann, Ziehen.

Allen meinen Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank aus.